

## Quiz – Préparation des échantillons pour la polymérisation en chaîne (PCR)

---

*Les réponses sont disponibles à la fin de ce document.*

On veut amplifier un segment d'ADN. Voici la concentration ou quantité finale à utiliser recommandée par le manufacturier dans un volume de 50 µl pour effectuer la PCR.

Constituants	Concentration ou quantité initiale	Concentration ou quantité finale
Tampon de la polymérase	10 X	1 X
Amorce 5' à 3'	10 µM	1 µM
Amorce 3' à 5'	10 µM	1 µM
DNT	40 mM	0,2 mM chaque (0,8 mM)
Polymérase	5 U/µl	1,25 U
ADN	Dosage	0,25 µg
Eau		Selon les volumes des autres constituants
Volume final		50 µl

Le dosage de l'ADN donne une concentration de 215 ng/µl (0,215 µg/µl).

Déterminer la quantité de chacun des constituants à placer dans le tube pour effectuer la réaction en tenant compte que le volume final sera de 50 µl.

## Réponses

### *Tampon de la polymérase*

$$C1 = 10 \text{ X}$$

$$C2 = 1 \text{ X}$$

$$V1 = ?$$

$$V2 = 50 \text{ } \mu\text{l}$$

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V1 = \frac{1 \text{ X} \times 50 \text{ } \mu\text{l}}{10 \text{ X}}$$

$$= 5 \text{ } \mu\text{l}$$

### *Amorces 5' à 3'*

$$C1 = 10 \text{ } \mu\text{M}$$

$$C2 = 1 \text{ } \mu\text{M}$$

$$V1 = ?$$

$$V2 = 50 \text{ } \mu\text{l}$$

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V1 = \frac{1 \text{ } \mu\text{M} \times 50 \text{ } \mu\text{l}}{10 \text{ } \mu\text{M}}$$

$$= 5 \text{ } \mu\text{l}$$

### *Amorces 3' à 5'*

$$C1 = 10 \text{ } \mu\text{M}$$

$$C2 = 1 \text{ } \mu\text{M}$$

$$V1 = ?$$

$$V2 = 50 \text{ } \mu\text{l}$$

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V1 = \frac{1 \text{ } \mu\text{M} \times 50 \text{ } \mu\text{l}}{10 \text{ } \mu\text{M}}$$

$$= 5 \text{ } \mu\text{l}$$

### *dNTP*

$$C1 = 40 \text{ mM}$$

$$C2 = 0,8 \text{ mM}$$

$$V1 = ?$$

$$V2 = 50 \text{ } \mu\text{l}$$

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V1 = \frac{0,8 \text{ mM} \times 50 \text{ } \mu\text{l}}{40 \text{ mM}}$$

$$= 1 \text{ } \mu\text{l}$$

### *Polymérase*

Concentration de l'enzyme = 5 U/ $\mu\text{l}$

On veut obtenir une quantité de 1,25 U

Si on place 1  $\mu\text{l}$ , on a 5 U

$$\frac{5 \text{ U}}{1,25 \text{ U}} = \frac{1 \text{ } \mu\text{l}}{x \text{ } \mu\text{l}}$$

$$x = 0,25 \mu\text{l}$$

#### ADN

Concentration de l'ADN =  $0,215 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

On veut obtenir une quantité de  $0,25 \mu\text{g}$

Si on place  $1 \mu\text{l}$ , on a  $0,215 \mu\text{g}$

$$\frac{0,215 \mu\text{g}}{0,25 \mu\text{g}} = \frac{1 \mu\text{l}}{x \mu\text{l}}$$

$$x = 1,16 \mu\text{l}$$

Note : On placera  $1,25 \mu\text{l}$  pour faciliter le pipetage, car ce volume ne dépasse pas les  $0,5 \mu\text{g}$  maximum d'ADN qu'on peut placer pour effectuer la réaction de PCR.

#### Eau

Les volumes obtenus lors des calculs subséquents permettront de déterminer le volume d'eau à ajouter afin d'obtenir un volume final de  $50 \mu\text{l}$ .

Constituants	Volume $\mu\text{l}$
Tampon de la polymérase	5
Amorce 5' à 3'	5
Amorce 3' à 5'	5
dNTP	1
Polymérase	0,25
ADN	1,25
<b>Volume total (excluant l'eau)</b>	<b>17,5</b>

En additionnant chacun des constituants présents dans le tube, on obtient un volume de  $17,5 \mu\text{l}$ . Puisqu'on veut obtenir un volume final de  $50 \mu\text{l}$  on soustraira ce volume de  $50$  ( $50 \mu\text{l} - 17,5 \mu\text{l}$ ). Ainsi, il faudra ajouter  $32,5 \mu\text{l}$  d'eau.